

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing: 01 March 2001 (01.03.01)	To: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No.: PCT/JP00/05590	Applicant's or agent's file reference: YCT-501
International filing date: 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date: 19 August 1999 (19.08.99)
Applicant: KATO, Yukio et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

08 September 2000 (08.09.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

E P

U S

特許協力条約

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-501	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。			
国際出願番号 PCT/JP00/05590	国際出願日 (日.月.年)	21.08.00	優先日 (日.月.年)	19.08.99
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社				

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 - この国際出願に含まれる書面による配列表
 - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする、 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意:

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	
BIOSIS (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, Vol. 83, No. 5, pp1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 4, pp3034-40	16 5-7, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 07. 11. 00	国際調査報告の発送日 21.11.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 6460  4C 2938

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P A	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta, 28. 10. 1999, Vol. 1447, No. 2-3, pp258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 256, No. 3, pp503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED) 25. 1月. 1995 (25. 01. 95) & JP, 7-82297, A	1-15
A	TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No. 22:1, Supplement43	9

本願の請求の範囲 1 - 10 に記載された発明は、MT f または MT f をコードするDNA を有効成分として含有する軟骨形成促進剤である。

本願の請求の範囲 11 - 12 に記載された発明は、MT f のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲 1 に記載の MT f と異なり、さらに用途も請求の範囲 1 とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲 1 - 10 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲 13 - 15 に記載された発明は、MT f を活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲 1 に記載の発明である MT f を有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲 1 - 10 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲 16 に記載された発明は、GPI アンカー領域を欠損した MT f であるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲 1 に記載された発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

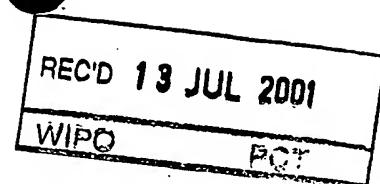


15T

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-501	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/05590	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 19.08.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15		
出願人（氏名又は名称） 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 08.09.00	国際予備審査報告を作成した日 27.06.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 6460
	4C 2938

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- 請求の範囲を減縮した。
- 追加手数料を納付した。
- 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- 満足する。
- 以下の理由により満足しない。

本願の請求の範囲11-12に記載された発明は、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲1に記載のMTfと異なり、さらに用途も請求の範囲1とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲1-10に記載の発明と单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲13-15に記載された発明は、MTfを活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲1に記載の発明であるMTfを有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲1-10に記載の発明と单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲16に記載された発明は、GPIアンカー領域を欠損したMTfであるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲1に記載された発明である医薬と单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- すべての部分
- 請求の範囲 _____ に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 請求の範囲	1-16	有 無
進歩性 (I S)	請求の範囲 請求の範囲	1-15 16	有 無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 請求の範囲	1-16	有 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, Vol. 83, No. 5, pp1261-1265

文献2 : FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 4, pp3034-3040

請求の範囲16について

文献1には、MT f タンパク質のアミノ酸配列が記載されている。

そして文献2には、MT f タンパク質はGPIアンカータンパク質であることが記載されている。

膜に局在するタンパク質において、その膜貫通ドメインや膜アンカードメインを適宜欠損させたタンパク質を調製してみることは当該技術分野の専門家が通常行うことであると認められるところ、文献1に記載のMT f タンパク質のアミノ酸配列から、文献2に記載のGPIアンカードメインを確認し、かつその欠損型を調製することは当該技術分野の専門家にとって自明である。

したがって、本願の請求の範囲16に係る発明は進歩性を有さない。

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 8, 14-15について

本願の請求の範囲 8には、「MTfを活性化する物質」と記載され、また請求の範囲 14-15には、「請求項 13記載の方法によって得られるMTfを活性化する物質」と記載されているが、当該物質として本願明細書において具体的に開示されているものは、実施例 2に記載のCM中に存在する物質のみであり、その他の当該活性をもつ物質については何ら記載されておらず、また本願出願時において、当該物質にどのようなものが含まれるかが当該技術分野の技術常識であったとも認められない。

したがって、本願明細書は、当該技術分野の専門家が本願の請求の範囲 8, 14-15に係る発明のうち本願明細書に具体的に開示されているものを除く部分について、実施できる程度に記載されていない。

LOT
Translation

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-501	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/05590	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date (day/month/year) 19 August 1999 (19.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P 19/02, C07K 14/47, 14/79, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 September 2000 (08.09.00)	Date of completion of this report 27 June 2001 (27.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

The inventions set forth in Claims 11 and 12 of this application are chondral differentiation inhibitors containing an MTf antagonist, but the active ingredient is different from the MTf set forth in Claim 1, and concerns inhibiting chondrogenesis, which is the antithesis of the use set forth in Claim 1. Therefore, these inventions and the inventions set forth in Claims 1-10 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The inventions set forth in Claims 13-15 of this application concern a screening method for substances activating MTf, the substance activating MTf obtained by the above screening method, and chondrogenesis promoters containing the substance activating MTf obtained by the above screening method. This examination finds that the inventions concerning the screening method and its dependent claims belong to a different category than the medicine having MTf as its active ingredient, which is the invention set forth in Claim 1. Therefore, these inventions and the inventions set forth in Claims 1-10 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The invention set forth in Claim 16 of this application is MTf with the deletion of the GPI anchor domain, but because this invention is a protein in which the application and the like are not specified, this invention and the medicine that is the invention set forth in Claim 1 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims	16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Rose, Timothy M., et al., "Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence," Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 83, No. 5, 1986, pp. 1261-1265

Document 2: Food, Michael R. et al., "Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, No. 4, 1994, pp. 3034-3040

Claim 16

Document 1 describes the amino acid sequence of the MTf protein.

Document 2 states that the MTf protein is a GPI anchored protein.

Because this examination finds that in the case of proteins localized on the cell membrane, it is conventional practice for persons skilled in the art to prepare proteins lacking the transmembrane domain or the membrane anchor domain as needed, it is obvious to persons skilled in the art to verify the GPI anchor domain described in document 2 from the amino acid sequence of the MTf protein described in document 1 and prepare the deleted form.

Therefore, the invention set forth in Claim 16 does not appear to involve an inventive step.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In Claim 8 the phrase "substance activating MTf" is used, and in Claims 14 and 15 the phrase "substance activating MTf that is obtained by the method set forth in Claim 13" is used. The only substance specifically disclosed in the Specification as an example of this substance is the substance present in CM of Example 2, and there is no description of other substances having this activity. In addition, at the time of filing it was unclear from conventional knowledge in the art what kinds of substances are to be included in this definition.

Therefore, with the exception of the portions specifically disclosed in the Specification from among the inventions set forth in Claims 8, 14 and 15, the Specification does not contain sufficient description such that persons skilled in the art can work the invention.

**COURTESY COPY OF THE
INTERNATIONAL
PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
IN JAPANESE**



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人 杜本 一夫	殿
あて名 〒 100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所	PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
(PCT規則71.1)

発送日 (日.月.年)	10.07.01
----------------	----------

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-501	重要な通知
------------------------------	-------

国際出願番号 PCT/JP00/05590	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 19.08.99
--------------------------	---------------------------	-------------------------

出願人（氏名又は名称） 中外製薬株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名 日本国特許庁（IPEA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特許庁長官	4C	2938
	電話番号 03-3581-1101 内線 6460		



注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

[申込方法]

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

[申込み及び照会先]

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-501	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/05590	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 19.08.99
国際特許分類 (IPC) Int.C1' A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15		
出願人（氏名又は名称） 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 08.09.00	国際予備審査報告を作成した日 27.06.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許序審査官（権限のある職員） 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 6460
	4C 2938



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c)) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- 請求の範囲を減縮した。
- 追加手数料を納付した。
- 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- 満足する。
- 以下の理由により満足しない。

本願の請求の範囲11-12に記載された発明は、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲1に記載のMTfと異なり、さらに用途も請求の範囲1とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲1-10に記載の発明と单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲13-15に記載された発明は、MTfを活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲1に記載の発明であるMTfを有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲1-10に記載の発明と单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲16に記載された発明は、GPIアンカー領域を欠損したMTfであるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲1に記載された発明である医薬と单一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

すべての部分

請求の範囲 _____ に関する部分



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-16 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-15 有
請求の範囲 16 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-16 有
請求の範囲 _____ 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, Vol. 83, No. 5, pp1261-1265

文献2 : FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 4, pp3034-3040

請求の範囲 1 6について

文献1には、MT f タンパク質のアミノ酸配列が記載されている。

そして文献2には、MT f タンパク質はGPIアンカータンパク質であることが記載されている。

膜に局在するタンパク質において、その膜貫通ドメインや膜アンカードメインを適宜欠損させたタンパク質を調製してみることは当該技術分野の専門家が通常行うことであると認められるところ、文献1に記載のMT f タンパク質のアミノ酸配列から、文献2に記載のGPIアンカードメインを確認し、かつその欠損型を調製することは当該技術分野の専門家にとって自明である。

したがって、本願の請求の範囲 1 6に係る発明は進歩性を有さない。



VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 8, 14-15について

本願の請求の範囲 8 には、「MT_f を活性化する物質」と記載され、また請求の範囲 14-15 には、「請求項 13 記載の方法によって得られる MT_f を活性化する物質」と記載されているが、当該物質として本願明細書において具体的に開示されるものは、実施例 2 に記載の CM 中に存在する物質のみであり、その他の当該活性をもつ物質については何ら記載されておらず、また本願出願時において、当該物質にどのようなものが含まれるかが当該技術分野の技術常識であったとも認められない。

したがって、本願明細書は、当該技術分野の専門家が本願の請求の範囲 8, 14-15 に係る発明のうち本願明細書に具体的に開示されているものを除く部分について、実施できる程度に記載されていない。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79,
C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79,
C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	
BIOSIS (STN)	

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1986, Vol.83, No.5, pp.1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp.3034-40	16 5-7,10
PA	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta, 28.10.1999, Vol.1447, No.2-3, pp.258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol.256, No.3, pp.503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED),	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 November, 2000 (07.11.00)

Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	25 January, 1995 (25.01.95) & JP, 7-82297, A TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No.22:1, Supplement 43	9



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/13951 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P 19/02, C07K 14/47, 14/79, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15 (74) 代理人: 村本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206室 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05590

(22) 国際出願日: 2000年8月21日 (21.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願平11/232966 1999年8月19日 (19.08.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 加藤幸夫 (KATO, Yukio) [JP/JP]; 〒732-0062 広島県広島市東区牛田早稻田3-6-9-501 Hiroshima (JP). 藤本勝巳 (FUJIMOTO, Katsumi) [JP/JP]; 〒734-0036 広島県広島市南区旭1-3-11-202 Hiroshima (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: CHONDROGENESIS PROMOTERS

(54) 発明の名称: 軟骨形成促進剤

(57) Abstract: Chondrogenesis promoters containing MTf; chondral differentiation inhibitors containing an MTf antagonist; a method of screening a substance activating MTf; the substance activating MTf obtained by the above screening method; chondrogenesis promoters containing the substance activating MTf obtained by the above screening method; and MTf with the deletion of the GPI anchor domain.

(57) 要約:

MTf を含む軟骨形成促進剤、MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られる MTf を活性化する物質、該スクリーニング方法によって得られる MTf を活性化する物質を含む軟骨形成促進剤、ならびに GPI アンカー領域を欠損した MTf を提供する。

WO 01/13951 A1



明細書
軟骨形成促進剤

技術分野

5 本発明は新規な軟骨形成促進剤に関する。さらに詳しくは、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (membrane-bound transferrin-like protein : 以下において MTf ということもある) を含む軟骨形成促進剤に関する。

従来技術

10 動物の軟骨組織は軟骨細胞 (chondrocytes) と細胞間基質 (matrix) により構成されている。軟骨組織は胎生期の骨格の大部分を占めており、出生後は内軟骨性骨化により、骨組織に置き換わってゆく。内軟骨性骨化を開始するにあたって、軟骨細胞は静止軟骨細胞から増殖軟骨細胞となり、ついで肥大性軟骨細胞に分化していく (文献 ; 津田ら編集「骨の科学」1982年、東京医歯薬出版、p.11~29)。このように軟骨細胞は特に成長期の骨組織形成にとって必須な細胞であることがよく知られてきた。しかし軟骨細胞の分化や内軟骨性骨化についてはまだ未解明の領域が多い。

軟骨細胞膜には独自の糖蛋白が存在し、その膜蛋白が他の結合組織の細胞とは異なる軟骨細胞の特徴 (球形の細胞形態、軟骨マトリックスの大量分泌、軟寒天内での生存、増殖など) に寄与している可能性がある。この仮説に基づいて、ヤン (Yan) ら (Yan et al. ; J. Biol. Chem., vol.265, p.10125~10131, 1990) 及び加藤ら (加藤ら、日本骨代謝学会雑誌、vol.10, No.2, p.187~192, 1992) は種々のレクチンの軟骨細胞の分化、増殖に対する効果を調べ、中でもタチナタマレクチンであり α -D-マンノース残基および α -D-グルコース残基に親和性を有するコンカナバリンA (concanavalin A : 以下において Con A ということもある) が軟骨細胞の分化を協力に促進することを、プロテオグリカン (proteoglycan) の合成を増大させることなどを指標として明らかにしている。Con A で処理された軟骨細胞は、未熟な扁平形態から分化した球形に変化し、軟骨細胞の分化マークターであるプロテオグリカン及び I I 型コラーゲン産生、アルカリホスファター

ゼなどの発現、さらには石灰化を誘導する。このような分化誘導作用は他のレクチンでは見られない。

河本ら (Kawamoto et al., Eur. J. Biochem. vol.256, p.503-509, 1998) はさらに、Con A の作用を仲介するレセプターを探索する試みの中で、軟骨細胞上に存在する約 20 種類の Con A 結合蛋白のうちで、レチノイン酸処理した軟骨細胞 (脱分化し、Con A 反応性を消失する) において発現が低下する 76 kDa の蛋白 (p76) に注目した。ウサギ軟骨細胞膜分画より Con A アフィニティーカラムクロマトグラフィーにて p76 を精製した後、N 末端部分アミノ酸配列を決定、遺伝子をクローニングした。アミノ酸配列及びその cDNA の核酸配列から、p10 76 は、ヒトのメラノーマなどの腫瘍に高発現されている腫瘍抗原として知られていたメラノトランスフェリン (p97) と 86 % のアミノ酸同一性を示し、そのカウンターパートであると考えられた。従来、p97 の生理的機能は不明であり、その発現も腫瘍細胞でのみ高く、正常組織ではほとんど検出されないと報告されていた。

p76 は Con A との結合性から軟骨細胞の分化あるいはその機能発現に関与していることが推定されたが、これらのタンパク質が実際に軟骨細胞又はその前駆細胞にどのような影響を及ぼすかについては何ら確認されていなかった。

本発明の目的は、軟骨細胞の分化に関連する物質を明らかにし、さらにはこれを用いた新規な軟骨形成促進剤を提供することである。本発明は、軟骨細胞の機能の制御、及びゆくゆくは骨形成の促進をつかさどる物質の発明につながるものであり、このような物質は新しいタイプの軟骨代謝性疾患および骨代謝性疾患の治療、予防、診断につながるものである。

発明の開示

25 本発明者らは、上記の課題を解決するために、鋭意研究した結果、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (membrane-bound transferrin-like protein : MTf) 遺伝子を、軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しないマウス ATDC5 細胞株に導入して過剰発現させたところ、軟骨への分化を著しく誘導することを見出して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、膜結合型トランスフェリン様蛋白（MTf）を含む軟骨形成促進剤を提供する。

MTfとしては、ウサギp76タンパク質、ヒトp97タンパク質、マウスMTfタンパク質及びp76タンパク質もしくはp97タンパク質もしくはマウスMTfタンパク質をコードするDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質が好ましく、特にヒトp97タンパク質が好ましい。

MTfは以下のものから選択されるのが特に好ましい：

- 1) 配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 10 2) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質
- 3) 配列番号；15のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
- 4) 配列番号：2又は4又は15のタンパク質をコードするDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質。

15 本発明はさらに、MTfがそのGPIアンカー領域を欠損したものである前記軟骨形成促進剤を提供する。

本発明の軟骨形成促進剤はMTfを活性化する物質及び／又はインスリンと併用するとさらに効果が高められる。

本発明の軟骨形成促進剤は、以下の疾患に有用である：OA（変形性関節症）；
20 RA（リウマチ様関節炎）；外傷による関節軟骨損傷；自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持；耳、気管、鼻の軟骨の再建；離断性骨軟骨炎；椎間板、半月板の再生；骨折及び軟骨からの骨形成。

本発明はさらに、以下のいずれかのタンパク質をコードするDNAが組み込まれた発現ベクターを有効成分として含有する、軟骨形成を促進するための遺伝子
25 治療剤を提供する：

- 1) 配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 3) 配列番号；15のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
- 4) 配列番号：2又は4又は15のタンパク質をコードするDNAとストリンジ

エントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質；

4) 上記1)、2)、3)又は4)記載のタンパク質からGPIアンカー領域を欠損させたタンパク質。

5 本発明はさらに、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤を提供する。

MTfのアンタゴニストは、抗MTf抗体又はMTfをコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体であることが好みしい。

本発明はさらに、以下の工程を含む、MTfを活性化する物質のスクリーニング

10 方法を提供する：

1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞にMTfを過剰発現させた細胞株を調製し、；

2) 候補物質を工程1)で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして

3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質からMTfを活性化する物質を選択する。

本発明はさらに、上記方法によって得られるMTfを活性化する物質を提供する。

本発明はさらに、上記方法によって得られるMTfを活性化する物質を含む軟骨形成促進剤を提供する。

本発明はさらに、GPIアンカー領域を欠損したMTfを提供する。

20

図面の簡単な説明

図1は、MTf強制発現ATDC5変異株の作製手順の概略を示す。

図2は、ATDC5細胞変異株におけるMTf遺伝子の発現を示すNorthern blottingの図である（電気泳動の写真）。

25 図3は、ATDC5細胞変異株におけるMTfタンパクの発現を示すWestern Blottingの図である（電気泳動の写真）。

図4は、インスリン非存在下における、対照細胞(pC-1)とMTf過剰発現株(Full-1およびFull-5)の細胞播種29日目での軟骨細胞への分化の様子を示す写真（生物の形態を示す写真）である。

図 5 は、インスリン存在下における、対照細胞(pC-1)と MTf 過剰発現株(Full -1 および Full-5)の細胞播種 29 日目での軟骨細胞への分化の様子を示す写真(生物の形態を示す写真)である。

図 6 は、ウサギ軟骨細胞の培養上清添加の軟骨細胞分化誘導に及ぼす効果を示す写真(生物の形態を示す写真)である。

図 7 は、アンチセンス MTf RNA の過剰発現、及びインスリン存在下と非存在下におけるアグリカンの合成抑制を示す RT-PCR Southern Blotting の結果を示す図である。

10 発明を実施するための最良の形態

本発明において、膜結合型トランスフェリン様蛋白(MTf)とは、Con A と結合する軟骨細胞膜上のタンパク質であって、かつトランスフェリンのような鉄結合サイトを有するタンパク質をいう。さらに好ましくは、Con A による軟骨分化誘導を仲介する機能を有するタンパク質をいう。

15 MTf という用語は従来、メラノーマなどの腫瘍に高発現されている腫瘍抗原として知られていたメラノトランスフェリン(p 97)の略語として使用されていたが、p 97 が癌組織以外に軟骨で特に高レベルで発現しており、癌組織に特異的でないことが判明したので、本発明者らは MTf (membrane-bound transferrin-like protein) に対して MTf という用語を再命名した。

20 本発明において、MTf 活性とは、未分化な細胞に対して軟骨分化を誘導し、軟骨細胞に対してその機能発現を促進する活性をいう。

MTf の例としては、ウサギ p 76 タンパク質、ウサギ p 76 タンパク質のヒト相同体タンパク質である p 97 タンパク質、マウス MTf タンパク質ならびにこれらのタンパク質のアミノ酸の一部を欠失、置換、付加したものであって、MTf 活性を有するタンパク質、あるいは p 76 タンパク質もしくは p 97 タンパク質もしくはマウス MTf タンパク質をコードするDNAとストリンジェントな条件下(例えば、標準的な方法としては、文献(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように、6xSSC, 0.5% SDS, 10mM EDTA, 5xDenhardt's solution, 10mg/ml

denatured salmon sperm DNA の溶液中で 68 ℃でハイブリダイゼーションを行う) でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質が挙げられるが、これに限定されない。

ウサギ p 76 タンパク質は、ヒト p 97 タンパク質と相同であり、ウサギ p 9 5 7 と称されることもある (Kawamoto et al., Eur. J. Biochem. vol.256, p.503-509, 1998)。その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号 : 1 及び 2 に示す。ヒト p 97 タンパク質の塩基配列及びアミノ酸配列も公知である (Rose, T.M. et 10 al., Pro NAS 83, 1261-65, 1986)。その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号 : 3 及び 4 に示す。マウス MTf タンパク質は文献 (Biochim. Biophys. Acta, 1447:258-264, 1999) に記載されており、その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号 : 1 4 及び 1 5 に示す。これらの MTf タンパク質は種間での相同性が高く、マウス-ヒトでは 83 %、マウス-ウサギでは 82 %、ヒト-ウサギでは 86 % のアミノ酸の同一性がある。

p 76 / p 97 タンパク質は、C 末端アミノ酸のカルボキシル基に糖脂質 G P 15 I (グリコシルホスファチジルイノシトール) を結合し、これをアンカーとして膜につなぎ止められている、G P I アンカー型タンパク質である (p 76 については、尾田 良、広島大学歯学雑誌、29巻、1号、40-57, 1997; p 97 については Alemany, R. et al., J. Cell Science, 104, 1155-62, 1993)。後述する実施例で示すように、全長の MTf のみならず、G P I アンカー部分を欠損した MTf あるいは可溶性の MTf であっても、MTf を発現していない細胞でこれを発現させると軟骨分化誘導活性が確認された。従って、本発明では、このような可溶性の MTf、好ましくは G P I アンカー欠損型 MTf も軟骨形成調節剤として使用できる。なお、G P I アンカー欠損型 MTf とは、G P I アンカー部分の一部又は全てが欠損した可溶性 MTf をいい、例えばウサギ MTf の場合には、C - 末端の G P I ア 20 ンカー結合に必要な 28 残基を欠失した MTf、ヒト MTf 及びマウス MTf では、C - 末端の G P I アンカー結合に必要な 30 残基を欠失した MTf が挙げられる。

本発明で使用する MTf は天然型であっても組換え型であってもよく、それぞれ当業界に公知の方法で入手できる。以下に例示する。

天然型

MTfを得るには、例えば特開平7-82297号に記載の方法により軟骨細胞から得ることができる。簡単に述べると、軟骨細胞の材料としては、種々の動物の軟骨組織を使うことができるが、例えばウサギの肋軟骨成長板を材料として、加藤らの方法 (Kato et al. ; J. Cell Biol., vol. 100, p.477~485, 1985) に従い、
5 プロテアーゼ及びコラゲナーゼ処理により軟骨細胞を得ることができる。この分離された軟骨細胞は培養皿でウシ胎児血清 (FCS) を含む培地で 5% CO₂、9
5% 空気の環境下で 37°C で培養できる。この軟骨培養細胞を回収しホモジナイザーで破碎し、17% / 40% のショ糖平衡密度勾配による沈降平衡遠心により、
膜蛋白を分取することができる。得られた膜蛋白画分を直接にコンカナバリン
10 A・アフィニティカラムに展開するか、または、あらかじめコンカナバリンA以外のレクチンに結合する膜蛋白を除くために、例えば、代表的なレクチンである小麦胚芽レクチン (Wheat germlectin) のアフィニティカラムに一旦展開した後、コンカナバリンA・アフィニティカラムに展開する等の方法を使うことにより、
コンカナバリンA結合蛋白画分をさらに分取することができる。この得られたコ
15 ンカナバリンA結合蛋白の軟骨細胞に対する特異性は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、これらの分画を比較することで検討できる。目的とする軟骨細胞に特異的な糖蛋白質が特定できたらゲルから目的のバンドを切り出し、エレクトロエリューション等により抽出精製し、エンドグリコシダーゼを用いて糖蛋白質の糖質を分析できる。

20 組換え型

組換え型 MTf は、本発明の実施例に記載の方法あるいはこれに準じた方法を用いて、MTf 遺伝子を組み込んだプラスミドを宿主細胞にトランスフェクションして、MTf タンパク質を発現させることにより得ることができる。

しかし、これに限定されることなく、当業界で公知の種々の形質転換方法、宿
25 主細胞を使用することができる。例えば、MTf をコードする遺伝子を適当なベクターに組み込むことにより、原核細胞または真核細胞の宿主細胞を形質転換することができる。

さらに、これらのベクターに適当なプロモーターや形質発現にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能

である。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質として発現させ、精製を容易にしたり、発現量を上げたり、また精製工程において適当な処理を施すことにより、目的タンパク質を切り出すことも可能である。

5 一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように、多形現象を示すと考えられ、この多形現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

また、配列表の配列番号2又は4又は15のアミノ酸配列中の1個またはそれ
10 以上的アミノ酸を欠くかまたは付加したポリペプチド、あるいはアミノ酸が1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでも細胞周期調節活性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン2（IL-2）遺伝子のシステムに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドがIL-2活性を保持することも既に公知になっている（Wang et al.,
15 Science 224:1431, 1984）。これらのMTfタンパク質をコードする遺伝子の改変体を作製する技術は当業者には公知である。

また、真核細胞で発現させた場合、その多くは糖鎖が付加され、アミノ酸を1個ないしそれ以上変換することにより糖鎖付加を調節することができるが、この場合でも軟骨細胞分化誘導活性を有することがある。それゆえ、本発明ではMTf
20 タンパク質をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて、得られたポリペプチドが軟骨細胞分化誘導活性を有する限り、それらのポリペプチドをコードする遺伝子はすべて本発明に使用できる。

発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、プロモーター、RNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを含むことができる。

25 発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌などが挙げられる。また、真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばイースト、粘菌が挙げられる。あるいは、Sf9などの昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。さらに、動物細胞由来の宿主細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などが挙げられる。

以上のようにして MTf タンパク質をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養することにより產生されたタンパク質は細胞内または細胞外から分離し、精製することができる。なお、上述した配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子で得られたタンパク質のみならず、配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列の一部を置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含む遺伝子を用いて得られたタンパク質であっても MTf タンパク質の生物学的機能、即ち細軟骨細胞分化誘導活性を有する限りは本発明の軟骨形成促進剤に使用できる。

10 なお、MTf タンパク質の分離、精製には通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用することができる。例えば、各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析などを適宜選択、組み合わせて使用することができる。

本発明の軟骨形成促進剤は、上述した MTf をタンパク質の形で投与してもよく、あるいは遺伝子治療として使用することも可能である。

15 また、軟骨分化物質としては従来インスリンあるいはインスリン様成長因子が知られていたが、本発明の軟骨形成促進剤はインスリンの非存在下においても軟骨分化を誘導した。ただし、インスリンの存在下ではその効果がさらに強く観察されたので、MTf とインスリンあるいはインスリン様成長因子を併用することにより、軟骨修復作用をさらに強化することが期待できる。

20 さらに、軟骨細胞培養上清を添加すると、MTf 過剰発現株で著しい軟骨細胞の分化が観察され、軟骨細胞培養上清に MTf を活性化する物質が存在することが示唆された。従って、MTf と MTf を活性化する物質を併用することにより、軟骨修復作用をさらに強化することが期待できる。

MTf を活性化する物質は例えば以下の方法によって取得することができる：

25 1) 軟骨細胞培養系の培養上清から精製する；
2) MTf と結合するタンパク質の cDNA を軟骨細胞 cDNA ライブラリーからクローニングする；
3) イースト two hybrid 法で MTf と結合するタンパク質の cDNA をクローニングする。

また、種々の候補物質から MTf を活性化する物質をスクリーニングするには以下の工程を含む方法を用いることができる：

- 1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞に MTf を過剰発現させた細胞株を調製し、；
- 5 2) 候補物質を工程 1) で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして
- 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質から MTf を活性化する物質を選択する。

このようにして得られる MTf 活性化物質はそれ自体として軟骨形成促進剤に使用できる。

10 さらに、可溶性 MTf、好ましくは G P I アンカー領域を欠損した MTf は、MTf を発現していない細胞中で発現させると軟骨分化が誘導された。従って、可溶性 MTf、好ましくは G P I アンカー領域を欠損した MTf は軟骨形成調節剤に使用できる。

本発明の軟骨形成促進剤が適用できる疾患には以下のものが挙げられる：

- 15 1) O A (変形性関節症)
- 2) R A (リウマチ様関節炎)
- 3) 外傷による関節軟骨損傷
- 4) 自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持
- 5) 耳、気管、鼻の軟骨の再建
- 20 6) 離断性骨軟骨炎
- 7) 椎間板、半月板の再生
- 8) 骨折
- 9) 軟骨からの骨形成

本発明の軟骨形成促進剤は一般には、MTf タンパク質もしくは MTf 変異体（改変体）を導入した遺伝子治療として使用するのに有用である。本発明の遺伝子治療剤には、以下のいずれかのタンパク質をコードする D N A が組み込まれた発現ベクターを有効成分として含有する：

- 1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；

- 3) 配列番号；15のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
- 4) 配列番号：2又は4又は15のタンパク質をコードするDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつMTf活性を有するタンパク質；
- 5) 上記1)、2)、3)又は4)記載のタンパク質からGPIアンカー領域を欠損させたタンパク質。

MTf変異体をコードするDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発やPCR法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edt., 15章, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、PCR A Practical Approach, IRL Press 200-

10 210(1991))等の手法により、当業者ならば容易に作製することができる。

本発明における細胞導入用のDNAとして、MTfあるいはMTf変異体発現ベクターを用意する。発現ベクターは、MTfあるいはMTf変異体をコードするDNAを、例えばpSG5(ストラタジーン社)等の発現ベクターに連結することにより作製できる。次に、上記の導入用DNA混合物を細胞内に導入する。細胞としては、例えば骨髄間質細胞、線維芽細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、滑膜細胞、脱分化した軟骨細胞が挙げられる。細胞へのDNAの導入法としては、例えばリソ酸カルシウム法(横田崇・新井賢一編、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社、1994)が挙げられる。従って、該DNAを医薬の有効成分とすることにより、軟骨形成促進作用を有する遺伝子治療剤を調製することができる。このような遺伝子治療剤を投与すると、細胞内でMTfまたはその変異体が高発現し、該細胞内における軟骨の分化誘導作用を促進することが考えられる。従って本発明のMTf遺伝子治療剤は、前記した各種疾患の治療又は予防剤となる。

本発明の遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、実験医学増刊、12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」、羊土社(1996))のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス、又

はRNAウイルスに、MTfあるいは変異MTfをコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

また本発明の遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するin vivo法、およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すex vivo法がある(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1),23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)(1994))。in vivo法がより好ましい。

in vivo法により投与される場合は、疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、関節内注射、関節軟骨欠損部に直接塗布、埋め込み(パテ、ポリ乳酸など)、関節内徐放剤などの方法で投与できるが、静脈内注射も可能である。in vivo法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソームにした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

また、GPIアンカーを含まない可溶性タンパク質(GPIアンカー欠損型MTf)あるいは前述したMTf活性化物質の場合には、これらの投与法に加えて、タンパク質自体を種々の投与方法で投与することができ、さらにはこれを軟骨前駆細胞に添加することでも分化を誘導しうると思われる。

本発明の軟骨形成促進剤の投与量は、治療すべき疾患の種類、重症度や患者の年齢、体重などを考慮して、具体的には医師により決定される。GPIアンカーを含まない可溶性タンパク質(GPIアンカー欠損型MTf)あるいは前述したMTf活性化物質の場合には、一般的には1ng～1000mg/日、好ましくは1μg～100mg/日である。

本発明はさらに、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤を提供する。MTfのアンタゴニストとしては、抗MTf抗体又はMTfの塩基配列に基づいたアンチセンスDNA等を挙げることができる。

アンチセンスDNAは、MTfをコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である。

アンチセンスDNAは、mRNAに対して相補的塩基配列をもち、mRNAと塩基対を形成することにより、遺伝情報の流れを遮断し、最終産物である MTf の合成を抑制する。本発明において使用できるアンチセンスDNAは、配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と特異的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドである。

ここで「オリゴヌクレオチド」の語は、天然に存在する塩基および本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分から生成されたオリゴヌクレオチドおよびその類似体を意味する。したがって、この用語が含む第 1 の群は、天然に存在する種または天然に存在するサブユニットまたはそれらの同族体から生成された合成種である。また、サブユニットとは隣接するサブユニットに対してホスホジエステル結合または他の結合によって結合した塩基-糖の組み合わせをいう。

またオリゴヌクレオチドの第 2 の群はその類似体であり、これはオリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在していない部分を有する残基を意味する。

これらには、安定性を増加するためにリン酸基、糖部分、3'，5' 末端に化学修飾を施したオリゴヌクレオチドを含む。例えば、ヌクレオチド間のホスホジエステル基の酸素原子の 1 つを硫黄に置換したオリゴホスホチオエート、 $-CH_3$ に置換したオリゴメチルホスホネートなどが挙げられる。また、ホスホジエステル結合は、非イオン性かつ非キラル性である他の構造で置換されていてもよい。さらに、オリゴヌクレオチド類似体としては、修飾された塩基形態、すなわち天然に通常見いだされるもの以外のプリンおよびピリミジンを含む種を用いてよい。

本発明で使用するオリゴヌクレオチドは、好ましくは 5 ~ 40 個、さらに好ましくは 8 ~ 30 個、より好ましくは 12 ~ 30 個のサブユニットを有する。

本発明においては、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする mRNA の標的部分は転写開始部位、翻訳開始部位、イントロン／エキソン結合部位または 5' キャップ部位が好ましいが、mRNA の二次構造を考慮して立体障害のない部位を選択すべきである。

さらに、本発明においてはオリゴスクレオチドに代えて、ペプチド核酸(例えば、*Bioconjugate Chem.* Vol.5, No.1, 1994 を参照)を用いることもできる。

本発明の特に好ましい態様は、配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列とハイブリダイズし、MTf の発現を阻害しうるオリゴスクレオチド又はペプチド核酸である。
5

本発明によるオリゴスクレオチドは、当業界で公知の合成法、例えば *Applied Biosystems* 社などの合成装置を用いる固相合成法によって製造できる。同様の方法を用いて、他のオリゴスクレオチド類似体、例えば、ホスホロチオエートやアルキル化誘導体を製造することもできる(村上 章ら、「機能性アンチセンスDNAの化学合成」、有機合成化学、48 (3): 180-193、1990)。
10

本発明で使用できる MTf のアンタゴニストとしては、アンチセンスDNAである上記のような長さのオリゴスクレオチドに限定されない。内在性の MTf の産生を抑制するものであれば、より長いスクレオチド、好ましくは 500~600 ヌクレオチドのアンチセンスをゲノムに組み込むことによって、軟骨細胞の分化抑制に使用できる(実施例 3 参照)。
15

本発明で使用する抗 MTf 抗体は、配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を有するペプチドを認識する抗体であり、定法(例えば、新生化学実験講座 1、タンパク質 I、p. 389-397、1992 参照)を用いて、抗原となる配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を有するペプチドを動物に免疫し、生体内に產生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗体にはポリクローナル及びモノクローナル抗体を含み、これらの作製方法も当業者に公知である。
20

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されない。当業者には種々の変更、修飾が可能であり、これらも本発明の範囲に含まれる。
25

実施例

実験材料および方法

ウサギ軟骨細胞の培養

軟骨細胞は加藤らの方法 (Kato et al. ; J. Cell Biol., vol. 100, p.477~485, 1985) に準じてウサギ肋軟骨から単離した。すなわち、生後 4 週齢の雄性日本白色家兎（広島実験動物）の肋骨の静止軟骨部を分離し、メスにて細切した後、
5 8mg/mL アクチナーゼ E (科研製薬) と 5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Flow Laboratories 社) にて 1 時間、0.15%コラゲナーゼ (Worthington Biochemical 社) を含む DMEM にて 3 時間インキュベートした後、120 μm ナイロンフィルターを通過する細胞を回収した。本細胞を細胞培養用プラスチックシャーレー (Corning 社) に播種し、37°C、5%CO₂ 気相下にて
10 10%ウシ胎児血清 (三菱化成)、50 μg/mL アスコルビン酸、50U/mL カリウム、60 μg/mL カナマイシン (以上、明治製薬)、250 μg/mL アンホテリシン B (ICN Biochemical 社) を含むアルファ変法イーグル培地 (α -MEM、三光純薬) (medium A) または、無血清の DMEM (medium B) 中で培養した。

15 マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の培養

ATDC5 は理研細胞銀行 (筑波、日本) より購入した。細胞は 5%ウシ胎児血清 (FCS 三菱化成)、10 μg/mL ヒトトランスフェリン (Boehringer Mannheim 社) および 0.3nmol/mL 亜セレン酸ナトリウム (和光純薬) を含むハム F-12 培地 (Flow Laboratories 社) とダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Flow Laboratories 社) を 1:1 で混合した培地 (維持培地) にて、37°C、5%CO₂ 気相下で培養した。軟骨分化を誘導する場合は、この維持培地に 10 μg/mL ウシインスリン (Sigma 社) を加えた培地 (分化培地) で ATDC5 細胞を培養した。

ウサギ MTf の cDNA クローニングと塩基配列の決定

25 コンフルエントに達して 3 日後のウサギ軟骨細胞からグアニジンチオシアネット法によって total RNA を抽出した。そしてヒト MTf (Rose, T.M. et al., Pro NAS 83, 1261-65, 1986) の塩基配列に基づいて 5'-GGCTGGAACGTGCCGTGGGCTA-3' (forward) (配列番号 : 5) 、5'-GTCCTGGGCCTTGTCCAGCAGTC-3' (reverse) (配列番号 : 6) のプライマー

対を設計し、total RNA 1 μg から reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって 1.5kb の MTf cDNA 断片を増幅した。得られた cDNA 断片を pBluescript II SK ベクター (Stratagene 社) の SmaI 切断部に組み込んでクローニングし、Sequenase7-deaza-dGTP DNA sequencing kit (USB 社) を用いて塩基配列を決定した。次に完全長の cDNA を得るために Marathon cDNA amplification kit (Clontech 社) を用いて rapid amplification of cDNA end (RACE)を行った。具体的にはウサギ軟骨細胞の 2 本鎖 total cDNA に Marathon cDNA アダプターをライゲーションして、アダプタープライマーと上記で判明した MTf の塩基配列より設計した特異的プライマー (5'-
10 AGAGGGACTCCGAGTATCTGGTCTC-3' (forward) (配列番号 : 7) と 5'-GTCCGGCCCCGACACCAACATCTTC-3'(reverse) (配列番号 : 8)) を用いて RACE を行った。この増幅された cDNA サンプルを 4.5% アクリルアミドゲルにて分離して、その cDNA の主要バンドをゲルから抽出し、pBluescript II SK ベクターに組み込んでクローニングした。それらをテンプレートとして
15 Sequenase7-deaza-dGTP DNA sequencing kit および ABI autosequencer (ABI 社) を用いて、MTf 全長の塩基配列を決定した。

MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製

ウサギ MTf cDNA (Kawamoto T. et al., EJB 1998) の全長あるいは C-末端の GPI アンカー結合に必要な 28 残基に対応する部位を削除したものを pcDNA3.1/Zeo (+) プラスミド発現ベクター (サイトメガロウイルス極初期プロモーター／エンハンサーを含む : Invitrogen 社、San Diego, CA) に組み込んだ。すなわち、全長を含む EcoRI-NotI フラグメントをベクターより切り出し、pcDNA3.1/Zeo (+) の EcoRI-NotI 部位に組み込んだ。また、GPI アンカー結合部位を欠失した変異株を作製するには、PCR 法により C-末端の 28 アミノ酸手前にストップコドンを挿入したフラグメントを作製し、配列の確認を行った後、pcDNA3.1/Zeo (+) の EcoRI-NotI 部位に組み込んだ。

このようにして全長の MTf cDNA (MTf Full) と GPI アンカーの欠失した MTf cDNA (MTf(-)GPI) を挿入したプラスミド (pMTf Full あるいは pMTf (-)GPI)

を作製し、それぞれ ATDC5 細胞（理研、筑波、日本）にトランスフェクションした。トランスフェクションには SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN) を用いた。ゼオシン (Zeocin:Invitrogen 社) により選択し、安定なトランスフォーマントを作製した。

5 具体的には、ATDC5 細胞を 10 cm シャーレに 2×10^5 個の細胞を播種して、翌日、導入するプラスミド DNA を各 $2 \mu\text{g}$ (pMTf Full 及び pMTf(-)GPI) と SuperFect Transfection Reagent 溶液～ $40 \mu\text{L}$ をそれぞれ個別に無血清培地に溶解した後、要時速やかに混合して、無血清培地にて洗浄した細胞に添加した。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 気相下で 1 時間培養後、血清培地を添加してさらに 1 日間培養した。なお、
10 対照としてベクターのみをトランスフェクションした群も作製した。

トランスフェクション 1 日後、ゼオシンを $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含んだ血清添加培地で選択を開始し、2 日おきに培地交換を行いながら 2 週間培養した。その結果、MTf Full および MTf(-)GPI を安定に発現する ATDC5 細胞変異株を得て、以後はゼオジンを $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含んだ血清添加培地で継代した。

15 なお、MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製手順の概略を図 1 に示す。

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf 遺伝子の発現

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf 遺伝子の発現は Northern blotting にて確認した。具体的には ATDC5 変異株よりグアニジンチオシアネート法によって total
20 RNA を調製し、total RNA $10 \mu\text{g}$ を 2.2mol/L ホルムアルデヒドを含有する 1% アガロースゲル中にて電気泳動した後、Hybond-N membrane (Amersham 社) に転写した。このメンブレンを ^{32}P でラベルした 2.2kb のウサギ MTf cDNA プローブで 42°C 、16 時間ハイブリダイズした。メンブレンを洗浄後、BioMax X-ray film (Kodak 社) に -80°C で露光してシグナルを検出した。得られた結果を図 2
25 に示す。

その結果、MTf Full 株においてはクローンナンバー 1、4 および 5 においてウサギ MTf 遺伝子が強発現していることを確認した。

また、MTf(-)GPI 株においてはクローンナンバー 3、3 N、8、9 および 10 においてウサギ MTf 遺伝子が強発現していることを確認した。実施例では

(-)GPI-3 を使用した。

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf タンパクの発現

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf タンパクの発現は Western Blotting にて確
5 認した。具体的には ATDC5 変異株より膜画分タンパクを調製して、 $10\ \mu\text{g}/\text{lane}$ で SDS-PAGE を行い、 polyvinylidene difluoride membraen (Milipore 社)に転
写した。転写したメンブレンは 4%スキムミルクでプロッキングした後、抗 MTf
血清 (1:500 希釀 ; Eur. J. Biochem. 256, 503-509 (1998)) で 4°C 、 14 時間反応
させた後、 ^{125}I ヒツジ抗マウス IgG(Fab')2 フラグメント (Amersham 社) で室温、
10 2 時間反応させた。メンブレンを洗净後、 BioMax X-ray film に -80°C でエクス
ポーズして解析を行った。得られた結果を図 3 に示す。

その結果、 MTf Full 株においてはクローンナンバー 1 および 5 においてウサギ
MTf タンパクが強発現していることを確認した。これらのクローンを MTf 過剰
発現株 (Full -1 および Full-5) と命名した。

15

実施例 1 : MTf 過剰発現株における軟骨分化

MTf 過剰発現株を 6 穴マルチウェルプレートに 4.0×10^4 個の細胞を播種して、
維持培地にて 37°C 、 5%CO₂ 気層下で培養した。

MTf 過剰発現株は MTf Full 株において MTf の遺伝子とタンパクの発現を確認
20 した Full -1 および Full-5 株について検討した。 MTf(-)GPI 株においては、 MTf
の遺伝子の発現を確認した GPI-3 株について検討した。

対照細胞として、 ATDC5 細胞及び pC-1 (ベクターのみ) を同様に調製し、 顕
微鏡で形態学的特徴を観察した。なお、 細胞形態は、 オリンパス位相差顕微鏡を
用いて観察した。一つの培養系から 2 視野を写真にとり、 少なくとも 200 個の
25 細胞を数えて、 球形化した細胞の割合を算定した。

インスリン非存在下では対照細胞 (pC-1) は軟骨細胞に分化しないのに対して、
MTf 過剰発現株 (Full -1 および Full-5) 及び MTf(-)GPI 株 (-)GPI-3) は 20
日以内に分化を開始し、 細胞播種 29 日目には細胞のほぼ全域が軟骨細胞に分化
した (図 4) 。

さらに、インスリン（10(g/mL) 存在下 (Day 0 より添加) で、同様の試験を行った。インスリン非存在下のときと同様な結果が得られた（図 5）が、MTf 過剰発現株では、インスリン非存在下よりもさらに分化が誘導された。すなわち、インスリン非存在下よりも多くの細胞の細胞形態が軟骨細胞様に"round"していた。

これらの結果から、MTf は軟骨の分化誘導を促進する効果があることが明らかとなり、その効果はインスリンの非存在下でも示された。

実施例 2：ウサギ軟骨細胞の培養上清添加の効果

10 ウサギ軟骨細胞の培養上清は静止軟骨細胞 1×10^6 個の細胞を 10cm カルチャーディッシュに播種し、medium A (10mL) にて 37°C、5%CO₂ 気相下で培養した。コンフルエント後 2 日目に無血清の medium B (5mL) に交換して 24 時間後に、培養上清 (CM) を回収して実験に供した。なお、CM は回収後 5% になるようにウシ胎児血清を添加した。

15 MTf 過剰発現株 (Full-5) および対照株 (pC-1) の細胞を、6 穴マルチウェルプレートに各 8.0×10^4 個/well になるように細胞を播種して、維持培地にて 37°C、5%CO₂ 気層下で培養した。コンフルエントに達した 3 日後 (Day 7) より、先に回収した CM を全体の培養液の 60% になるように添加し、同時に 10 μg/mL ウシインスリンを添加して 37°C、5%CO₂ 気相下でさらに 48 時間培養した。

20 CM 添加開始 48 時間後、CM を添加した MTf 過剰発現株 (Full-5(+))CM) はほぼすべての細胞が軟骨細胞に分化し、基質合成の盛んな敷石状の軟骨細胞の形態を示した。これに対し、CM 非添加の MTf 発現株 (Full-5(-))CM) は、対照細胞であるベクターのみを発現させた細胞株 (pC-2(+))CM および(-)CM) とほぼ同じ細胞形態を示した。ベクターのみを発現させた細胞株では CM 添加による軟骨細胞の分化誘導は認められなかった（図 6）。

これらの結果は CM 中に MTf を活性化する物質が存在すること意味する。

実施例 3：アンチセンス MTf RNA の過剰発現による軟骨分化

MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製に用いたのと同様の方法によって、マウス

アンチセンス MTf RNA を過剰発現させた ATDC5 細胞変異株（A-01, A-05, A-08, A-09, A-11, A-12, A-23, A-24）を作製した。なお、マウスアンチセンス MTf RNA は、PCR (primer 5'-GGTGTGTTGAGGGCGTGGACTCT-3' (配列番号 : 9) 及び 5'-TCACCAACGGCTTGAGCACATCAC-3' (配列番号 : 10) を使用) で
5 マウス MTf の cDNA 断片を増幅し、それを pGEM-T Easy Vector (Promega) に組み込んだ後 ApaI-NotI で切り出して pcDNA3.1/Zeo(+) の ApaI-NotI 部位に組み込んだ（逆方向に挿入されていることになる）ものを用いた。増幅された部分の配列を配列番号 : 11 に示す。

なお、対照としてベクターのみをトランスフェクションした群も作製した
10 (pC-1)。

ノザンプロットでマウス MTf アンチセンスの発現を観察した。ノザンプロットに用いたプローブは上記で用いた ApaI-NotI 断片である。

軟骨細胞の分化抑制効果は、軟骨プロテオグリカンであるアグリカンの合成抑制を指標にし、インスリン（4日目から添加量 10 μ g/mL で添加した）の存在下と
15 非存在下において、RT-PCR Southern Blotting により試験した。具体的には、各クローンの細胞からグアニジンチオシアネート法によって total RNA を抽出した。この total RNA 1 μ g から SUPERSCRIPT pre-amplification system キット (Life Technologies 社) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとして、アグリカン遺伝子に対しては 5'-TGCTACTTCATCGACCC-3'
20 (forward) (配列番号 : 12) 、 5'-AAAGACCTCCCCCTCCATCT-3' (reverse) (配列番号 : 13) のプライマー一対を用いて PCR を行った。この PCR 反応液を 1% アガロースゲル中に電気泳動した後、Hybond-N membrane (Amersham 社) に転写した。このメンブレンを 32 P でラベルしたアンチセンス MTf プローブ及び
マウスアグリカン cDNA プローブで 42°C、16 時間ハイブリダイズした。メンブ
25 レンを 0.5% SDA 含有 0.2XSSC で洗浄後、BioMax X-ray film (Kodak 社) に -80°C で露光してシグナルを検出した。

得られた結果を図 7 に示す。アンチセンス MTf RNA は、変異細胞株 A-12 (レーン 6) で最も強く、次いで A-11 (レーン 5) で強く発現していた。これと対応して、アグリカンの遺伝子発現は変異細胞株 A-12 (レーン 6) で最も強く抑制さ

れ、次いで A-11 (レーン 5) で強く抑制された。アグリカン遺伝子発現の抑制効果はインスリンの非存在下でも観察されたが、インスリン存在下ではさらに抑制効果は強くなった。

請求の範囲

1. 膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) を含む軟骨形成促進剤。
2. MTf がウサギ p 7 6 タンパク質、ヒト p 9 7 タンパク質、及び p 7 6 タン
5 パク質もしくは p 9 7 タンパク質をコードするDNAとストリンジエントな条件
下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ
MTf 活性を有するタンパク質からなる群より選択される請求項 1 記載の軟骨形
成促進剤。
3. MTf が以下のものから選択される請求項 1 記載の軟骨形成促進剤：
10 1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
3) 配列番号；1 5 のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
4) 配列番号：2 又は 4 又は 1 5 のタンパク質をコードするDNAとストリンジ
エントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列
15 を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質。
4. MTf がヒト p 9 7 タンパク質である請求項 2 記載の軟骨形成促進剤。
5. 可溶性 MTf を含む軟骨形成調節剤。
6. 可溶性 MTf がそのG P I アンカー領域を欠損したものである、請求項 5 記
載の軟骨形成調節剤。
20 7. 以下のいずれかのタンパク質をコードするDNAが組み込まれた発現ベク
ターを有効成分として含有する、軟骨形成を促進するための遺伝子治療剤：
1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
3) 配列番号；1 5 のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
25 4) 配列番号：2 又は 4 又は 1 5 のタンパク質をコードするDNAとストリンジ
エントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列
を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質；
5) 上記 1) 、 2) 、 3) 又は 4) 記載のタンパク質から G P I アンカー領域を
欠損させたタンパク質。

8. MTf を活性化する物質と併用する請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。
9. インスリンあるいはインスリン様成長因子と併用する請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。
10. OA (変形性関節症) ; RA (リウマチ様関節炎) ; 外傷による関節軟骨損傷；自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持；耳、気管、鼻の軟骨の再建；離断性骨軟骨炎；椎間板、半月板の再生；骨折及び軟骨からの骨形成からなる群より選択される軟骨分化が関与する骨疾患を治療するための請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の軟骨形成促進剤。
 11. MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤。
12. MTf のアンタゴニストが抗 MTf 抗体又は MTf をコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である請求項 11 記載の軟骨分化抑制剤。
13. 以下の工程を含む、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法：
 - 1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞に MTf を過剰発現させた細胞株を調製し、；
 - 2) 候補物質を工程 1) で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして
 - 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質から MTf を活性化する物質を選択する。
14. 請求項 13 記載の方法によって得られる MTf を活性化する物質。
15. 請求項 13 記載の方法によって得られる MTf を活性化する物質を含む軟骨形成促進剤。
16. GPI アンカー領域を欠損した MTf。



図1

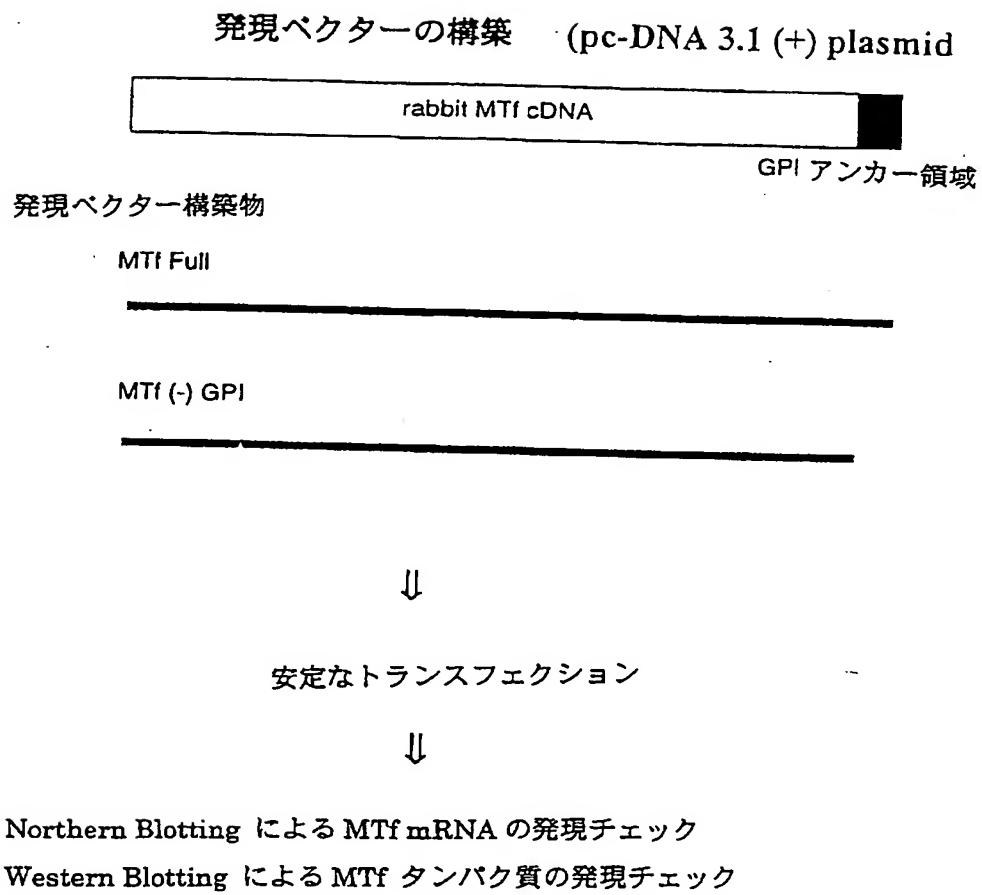




図 2.

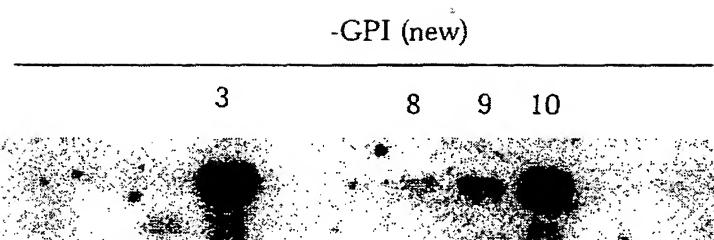
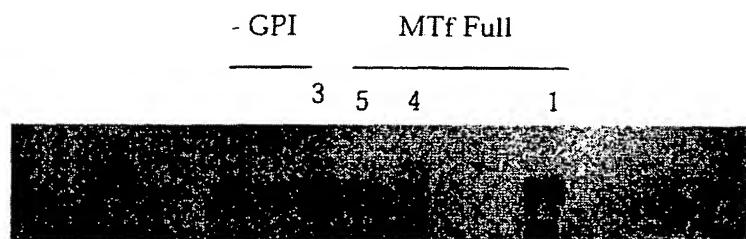


図 3

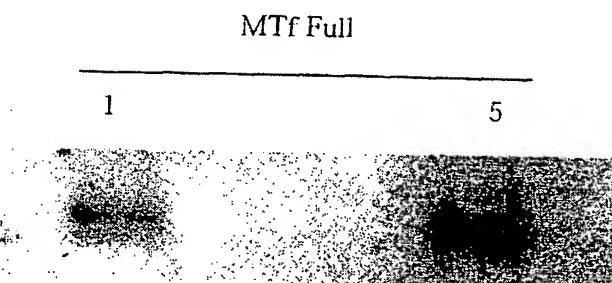


図 4

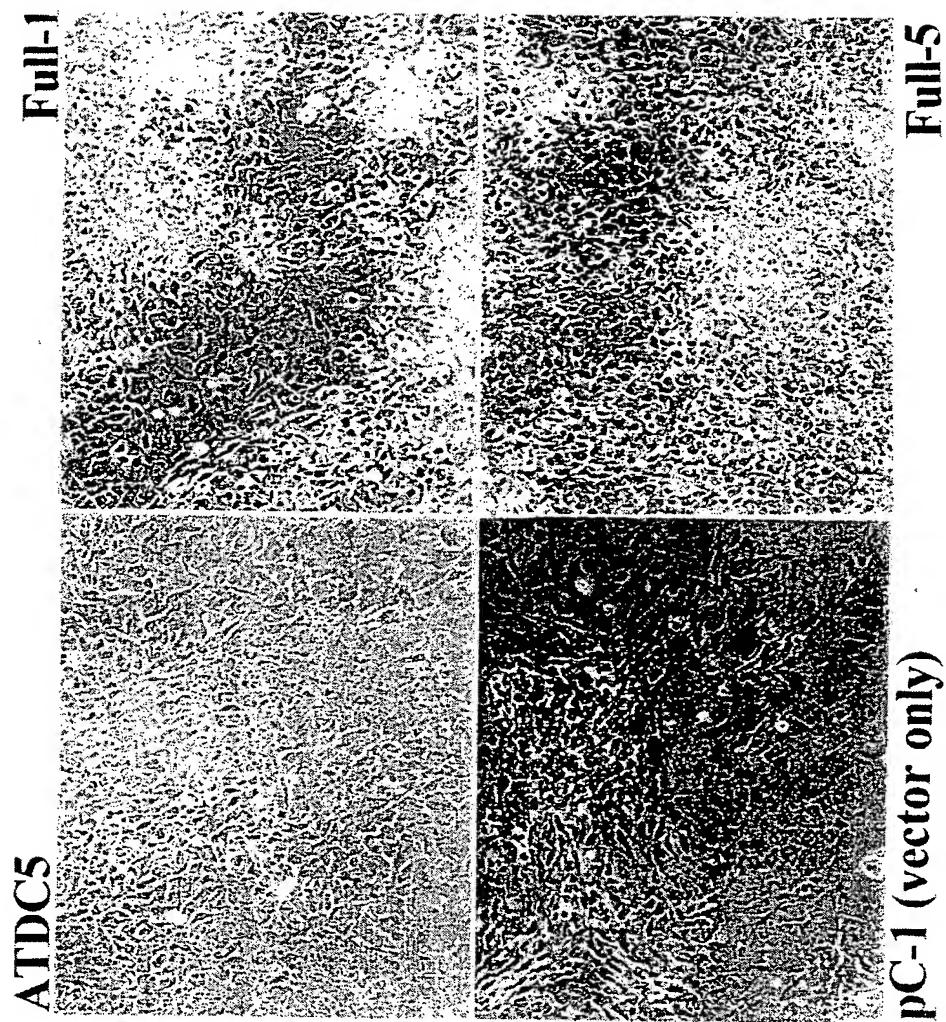


図 5

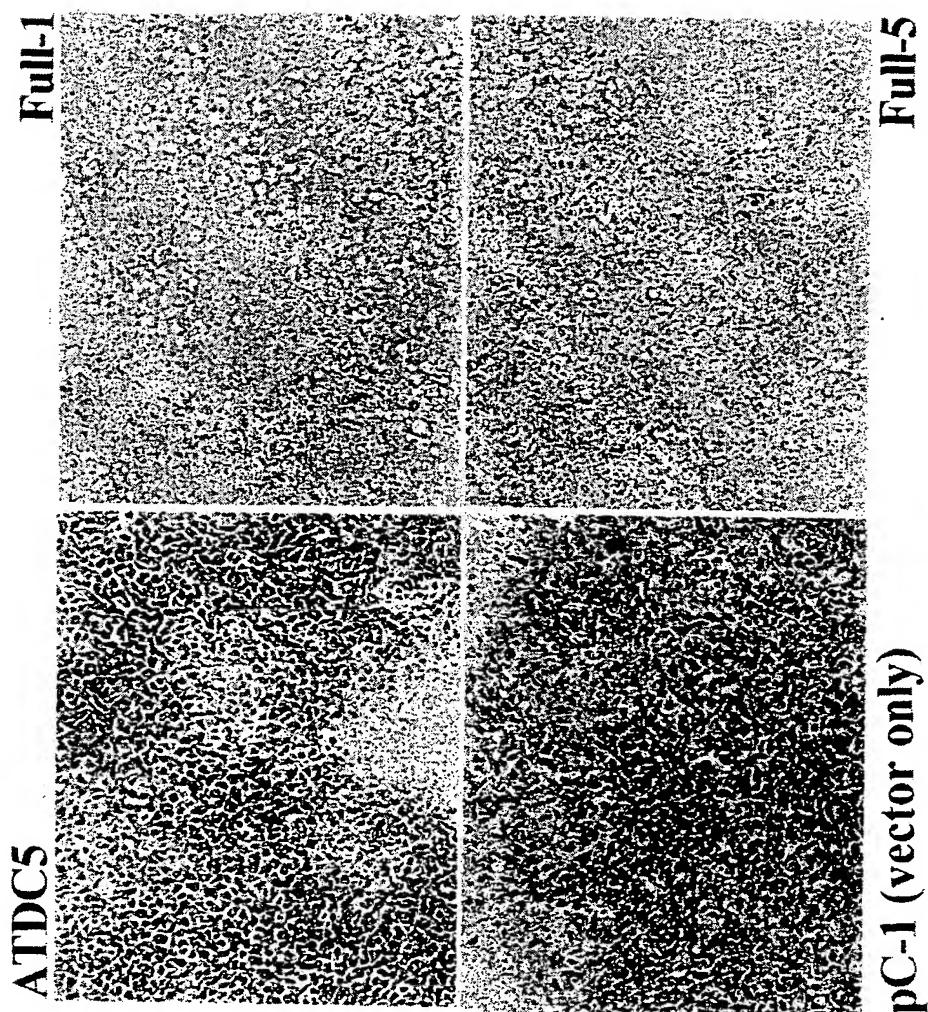
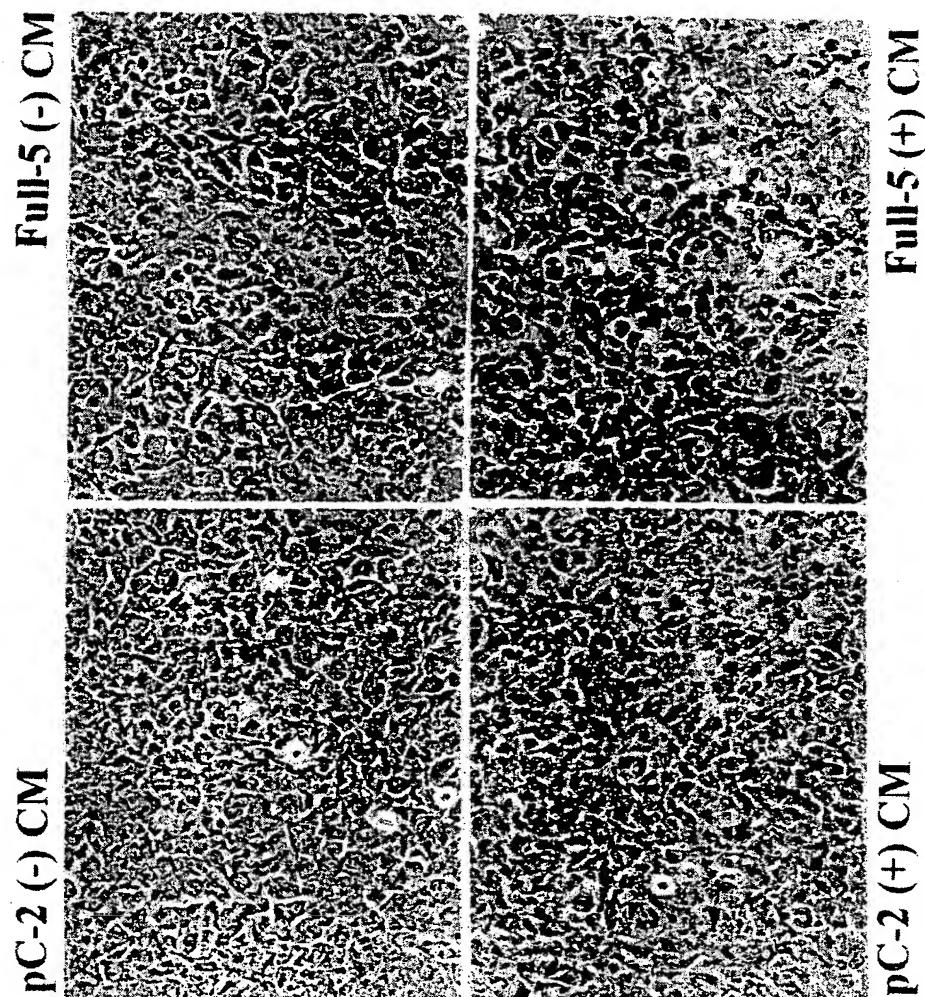


図 6





アンチセンス

1 2 3 4 5 6 7 8



アンチセンス MTf RNA

(-)インスリン 23日目



アグリカン

(+)インスリン 17日目



アグリカン

1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1 = A-01
- 2 = A-05
- 3 = A-08
- 4 = A-09
- 5 = A-11
- 6 = A-12
- 7 = A-23
- 8 = A-24
- 9 = pC-1



【配列表】

<110> 中外製薬株式会社

<120> 軟骨形成促進剤

<130> YCT-501

<160> 15

<210> 1

<211> 2388

<212> cDNA

<213> Rabbit

<400> 1

gccggccgctc actcggttcgc actcggaactc agacccagtc cgacccctg gactgcgc 60
tgccggtgccg aaggcgccgt atgtggatct tcctggccct gcgcaccgca ctgcggcagcg 120
tggagggtgcg ggggtgcacc gcgtccgagc ccgagcagca gaagtgcgag gacatgagcc 180
aggccttcgg cgaagccggc ctccagccccg ccctgtgtcg cgtgcagggc acctcggccg 240
accactgcgtt ccagctcatc gcggcccacg aggccgacgc catcactctg gacggaggag 300
ccatttacga ggcggggaaag gaacacggcc tgaagccgt gggtggcgaa gtgtatgacc 360
aagagggtggg cacctccatc tacgtgtgg ccgtggtaa gaggagctcc aacgtgacca 420
tcaacacccct gagaggcggtg aagtcgtgcc acacggcat caaccgcacg gtgggttgaa 480
acgtgcgtgtt gggcttaccgt gtggacagcg gccgccttc agtgtatggc tggtacgtgc 540
tcaaaggcggtt cagcgagttac ttccggggca gctgcgttccc tggggcagga gagaccagat 600
actcggaatc cctctgttcgc ctctggccgg ggcacaccgc cggggagggg gtgtgtgaca 660
agagcccccgtt ggagcggttac tacgactaca gcggggccctt ccgtgtgtcg gcagaaggcg 720
caggggacgtt ggccttttgta aagcacagca cgggtgttggaa acacacggat gggagaacac 780
tgccctccgtt gggccacatc ctgtatgttac gggactttgtt gctgtgtgc cgggacggca 840
gccggggccatc cgttacccgag tggcagcact gccacccgtt ccgggtgtccc gcccacggcc 900
tgggtgttccgtt ggccgacacc gacgcaggcc tcatcttcgg gcttctcaat gagggccagc 960
ggctgtttagt ccacgagggtt acgacgttcc agaigtgttacatc ttcggaggcc tacggccaga 1020
agaacctgtt gttcaaaagac tccacgttgg agtgggttcc catgcacaca cagacccatc 1080

aggccctggct gggccccgag tacctgcacg ccatgaaggg tctgcctgt gacccaacc 1140
ggctgcccc atacctgcgc tggtgcgtgc tgtccacccc cgagatccag aagtgtggag 1200
acatggccgt ggccttcagc cggcagaggc tcaagccgga gatccagigt gtctcgccgg 1260
agcccccca gcacigcatg gagcagatcc aggctggca catcgaigct gtgaccctga 1320
acggggagga cattcacaca gcgggagaaga ctatggct gatccggct gccggggagc 1380
tgtatgccgc ggacgacagg agtaactcgt acttcgtgggt ggccgtgggt aagcgagaca 1440
gcccctacgc ttacccgtg gacgagctgc gcgggaagcg ctcctgccac cccggcttcg 1500
gcagccccggc cggcgggac gtcccggtgg gcgcctcat ccactggggc tacatccggc 1560
ccaggaacig cgacgtccic acagcgggtgg gtcagttttt caacgccagc tgtgtgccgg 1620
tgaacaaccc caagaagtac ccctccctgc tgtgcgcact ctgcgtgggt gacgagcagg 1680
gccgcaacaa gtgcactggc aacagccagg agcggtaacta tggcgacagt ggcccttca 1740
ggtgccgttgtt ggagggtgca ggggacgtgg ctttcgicaa gcacacgacc attttgaca 1800
acacaaatgg ccacaatccc gagccgtggg ctgcccattt gaggagccag gactacgagc 1860
tgctgtgccc caacggcgcg cgagctgagg cgcaccagtt tgccgcccgc aacctggccc 1920
agatccgtc ccacggccgtc atggcgccgc ccgacaccaa catcttcacc ttacggac 1980
tgctggacaa ggcccaggac ctgttggag acgaccacaa caagaacggg ttcaagatgt 2040
tcgacccic cagctaccac ggccgagacc tgccttcaa ggacccacg gtgcgcgtc 2100
tgccgtgtgg cgagaggacc acctaccagg actggctggg gccggactac gtggcggctc 2160
tggaaaggat gcagtcacag cgggtcgtcag gggcagccgt cggcgcccccc gggccctcgc 2220
tgctggccgt gctgccccctg gctgcgggcc tcctgctgtc ttgcctgtga gaggcagcccc 2280
ggcagccic ggccccggca ggggagccgt cgcggaaagct tcctgaacga gcccgcgcc 2340
tggctggatg tggttaccctc ggcgagccgc ggggcccgcgc ttcccccg 2388

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Rabbit

<400> 2

Met Arg Cys Arg Ser Ala Ala Met Trp Ile Phe Leu Ala Leu Arg Thr

1	5	10	15
Ala Leu Gly Ser Val Glu Val Arg Trp Cys Thr Ala Ser Glu Pro Glu			
20	25	30	
Gln Gln Lys Cys Glu Asp Met Ser Gln Ala Phe Arg Glu Ala Gly Leu			
35	40	45	
Gln Pro Ala Leu Leu Cys Val Gln Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val			
50	55	60	
Gln Leu Ile Ala Ala His Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly			
65	70	75	80
Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly			
85	90	95	
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val			
100	105	110	
Val Lys Arg Ser Ser Asn Val Thr Ile Asn Thr Leu Arg Gly Val Lys			
115	120	125	
Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val			
130	135	140	
Gly Tyr Leu Val Asp Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val			
145	150	155	160
Leu Lys Ala Val Ser Glu Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala			
165	170	175	
Gly Glu Thr Arg Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp			
180	185	190	
Thr Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr			
195	200	205	
Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val			
210	215	220	
Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Arg Thr			
225	230	235	240

Leu Pro Ser Trp Gly His Met Leu Met Ser Arg Asp Phe Glu Leu Leu
245 250 255
Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Ser Val Thr Glu Trp Gln His Cys His
260 265 270
Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp
275 280 285
Ala Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser
290 295 300
His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln
305 310 315 320
Lys Asn Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Leu Glu Leu Val Pro Ile Ala
325 330 335
Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Pro Glu Tyr Leu His Ala Met
340 345 350
Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp
355 360 365
Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val
370 375 380
Ala Phe Ser Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala
385 390 395 400
Glu Ser Pro Gln His Cys Met Glu Gln Ile Gln Ala Gly His Ile Asp
405 410 415
Ala Val Thr Leu Asn Gly Glu Asp Ile His Thr Ala Gly Lys Thr Tyr
420 425 430
Gly Leu Ile Pro Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Ala Ala Asp Asp Arg Ser
435 440 445
Asn Ser Tyr Phe Val Val Ala Val Val Lys Arg Asp Ser Ala Tyr Ala
450 455 460
Phe Thr Val Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Pro Gly Phe

465	470	475	480
Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile His Trp			
485	490	495	
Gly Tyr Ile Arg Pro Arg Asn Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Gly Gln			
500	505	510	
Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Lys Tyr Pro			
515	520	525	
Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys			
530	535	540	
Cys Thr Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Phe			
545	550	555	560
Arg Cys Leu Val Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr			
565	570	575	
Thr Ile Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ala			
580	585	590	
His Leu Arg Ser Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg			
595	600	605	
Ala Glu Ala His Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Ser			
610	615	620	
His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly			
625	630	635	640
Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn			
645	650	655	
Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Tyr His Gly Arg Asp Leu Leu			
660	665	670	
Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Arg Thr Thr			
675	680	685	
Tyr Gln Asp Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met			
690	695	700	

Gln Ser Gln Arg Cys Ser Gly Ala Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Ser
705 710 715 720
Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ser Ser Leu
725 730 735

<210> 3

<211> 2341

<212> cDNA

<213> Human

<400> 3

gcggacttcc tcggacccgg acccagcccc agcccggccc cagccagccc cgacggcgcc 60
atgcggggtc cgagcggggc tctgiggctg ctccctggctc tgccgtaccgt gctcgaggc 120
atggagggtgc ggigggcgcc cacctcggac ccagagcagc acaagtgcgg caacatgagc 180
gaggcccttcc gggaaagcggg catccagccc tccctccctc gcgtccgggg caccctccgcc 240
gaccacigcg tccagctcat cgccggccag gaggctgacg ccatcactct ggtatggagga 300
gccatctatg aggccggaaa ggagcacggc ctgaagccgg tggtgggcga agtgtacgat 360
caagaggctcg gtacctccctt ttaacctccgtg gctgtggtca ggaggagctc ccatgtgacc 420
attgacaccc taaaaggcgt gaagicctgc cacacggca tcaatcgac agtgggcgtgg 480
aacgtgcccgg tgggttacctt ggtggagagc ggccgcctct cggtgatggg ctgcgtatgt 540
ctcaaagctg tcagcgacta ttttggggc acgtcgctcc cgggggcagg agagaccagt 600
tactctgagt ccctctgtcg cctctcgagg ggtgacagct ctggggaaagg ggtgtgtgac 660
aagagcccccc tggagagata ctacgactac agcggggct tccggigcctt ggcggaaagg 720
gcaggggacg tggctttgtt gaagcacagc acggtactgg agaacacgga tgggaagacg 780
cttccctccctt gggccaggc cctgcgttca caggacttgc agctgtgttgc ccggatgtt 840
agccggccgg atgtcaccga gtggaggcag tgccatctgg cccgggtgtcc tgctcacgcc 900
gigggttcc gggccgacac agatggggc ctcatcttcc ggctgttca cgaaggccag 960
cgctgttca gccacgaggg cagcagcttc cagatgttca gctctgaggc ctatggccag 1020
aaggatctac ttttcaaaga ctctaccctcg gagcttgc ccatcgccac acagaccat 1080
gaggcgtggc tggccatga gtaccctgcac gccatgaagg gtctgttgc tgaccccaac 1140

cggttgtcccc cctacccatcg ctgggtgtg ctctccatc ccgagatcca gaagtgtgga 1200
gacaatggccg tggcccttcgg ccggcagcgc ctcaagccag agatccagtg cggtcagcc 1260
aagttccccc aacactgcat ggagcggatc caggctgagc aggtcgacgc tgtgacccta 1320
agtggcgagg acatttacac ggcgggaaag aagtacggcc tggttcccgcc agccggcgag 1380
cactatgccc cggaagacag cagcaactcg tactacgtgg tggccgttgt gagacgggac 1440
agctccccacg ccitcacctt ggatgagctt cggggcaagc gctccatggca cgccggtttc 1500
ggcagccctg caggctggga tgtccctgtt ggtgccctta ttccagagagg ctccatccgg 1560
cccaaggact gtgacgttcc cacagcgttg agcgagtttcaatgccag ctgcgtggcc 1620
gtgaacaacc ccaagaacta cccctccctg ctgtgtgcac tgtgcgtggg ggacgagcag 1680
ggccgcaaca agtgtgtggg caacagccag gagcggtaat acggctaccg cggcccttcc 1740
agggtccctgg tggagaatgc gggigacgtt gccttcgtca ggcacacaac cgttttgac 1800
aacacaaacg gccacaattc cgagccctgg gctgtcgac tcaggtaaga ggactatgaa 1860
ctgtgtgtcc ccaacggggc ccgagccgag gttccctgtt tggccctgtt caacciggca 1920
cagataaccac cccacgcccgtt gatggccgg cccgacacca acatcttcac cgtgtatgga 1980
ctgtgtggaca aggcccagga cctgttttgg gacgaccaca ataagaacgg ttcaaaaatg 2040
ttcgacttcc ccaactatca tggccaagac ctgttttca aggtgccac cgtccggcgc 2100
gtgcctgtcg gagagaaaaac caccatccgc ggctggctgg ggctggacta cgtggcggcgc 2160
ctggaaaggga tgtcgctca gcagtgctcg ggccgacccgg ccccgccgc cggggcgccc 2220
ctgtcccgcc tggctgtgcc cgccttcgtcc gcccggctgc tcccgccgc cctctgagcc 2280
cggccgcccc gccccagagc tccgatgccc gcccggggag ttccgcggc ggcccttcgc 2340
gctgcggaat ccagaaggaa gctcgcga 2368

<210> 4

<211> 738

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr

1

5

10

15



Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu
20 25 30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile
35 40 45

Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val
50 55 60

Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
85 90 95

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
100 105 110

Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys
115 120 125

Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val
130 135 140

Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val
145 150 155 160

Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala
165 170 175

Gly Glu Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp
180 185 190

Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr
195 200 205

Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val
210 215 220

Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr
225 230 235 240

Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu



	245	250	255
Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His			
260	265	270	
Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp			
275	280	285	
Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser			
290	295	300	
His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln			
305	310	315	320
Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala			
325	330	335	
Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met			
340	345	350	
Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp			
355	360	365	
Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val			
370	375	380	
Ala Phe Arg Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala			
385	390	395	400
Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp			
405	410	415	
Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Lys Tyr			
420	425	430	
Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser			
435	440	445	
Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala			
450	455	460	
Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe			
465	470	475	480

Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg
485 490 495
Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu
500 505 510
Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro
515 520 525
Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys
530 535 540
Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe
545 550 555 560
Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr
565 570 575
Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala
580 585 590
Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
595 600 605
Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro
610 615 620
His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly
625 630 635 640
Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
645 650 655
Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu
660 665 670
Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr
675 680 685
Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met
690 695 700
Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro



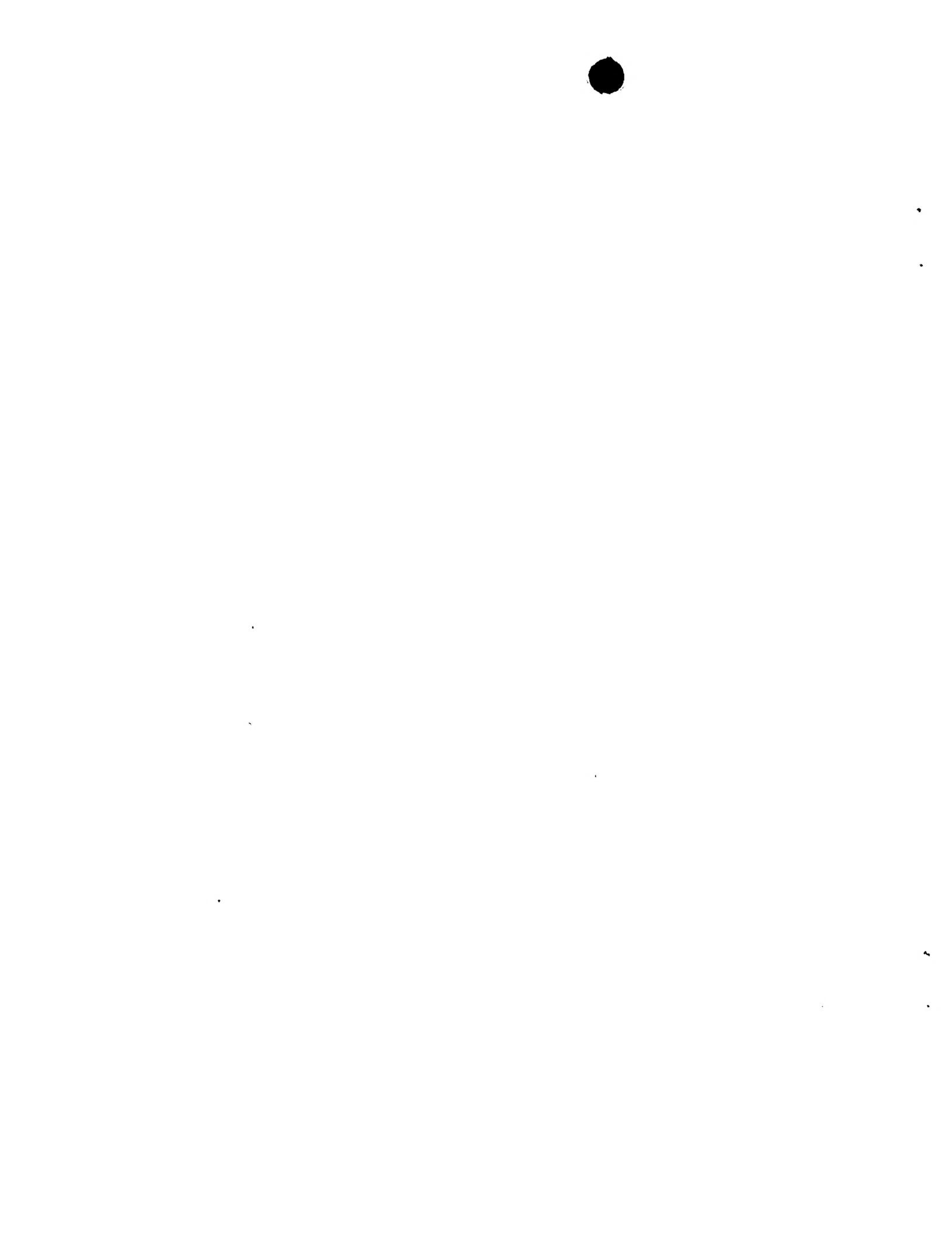
705 710 715 720
Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro
725 730 735
Ala Leu

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 5
ggctggaacg tgcccggtggg cta

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 6
gtccctgggcc ttgtccagca gtc

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 7
agagggactc cgagtatctg gtctc

<210> 8
<211> 24
<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<400> 8

gtccggccccg acaccaacat cttc

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ggtgtgttga ggggcgtgga ctct

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

tcaccaacgg ctttgagcac atcac

<210> 11

<211> 614

<212> RNA

<213> Mouse

<400> 11

tcaccaacgg ctttgagcac atcacagccc atcactgaca gatggccgt ctctacgagg 60

taaccgacag gcacgttcca gcccacagtc cggttaatgc ctgtgtggca ggacttgcac 120

cccttcaggg ttttgcgttgc aacattggaa ttccctccgttccac ccacagccac ggcataatag 180

gaaggcccaa tgctttggtc atagacttcc cccaccactg gcttcaggcc gtgttttttc 240

cctgcctcat agatggccccc tccatccagg gtgtatggcat ctgttttttgc ttcccttgcgttgc 300

agctggacac agtggtcagc ggagtggccc tggacgcaga gaaggaaagg acgaatgcc 360



gctccctggaa aggcctcgcct catgtctttg cacttctgtc gctctgcgtc tgagatggta 420
caccacgtca cctccatcac acagacgaca gtgcgcaggc acaggagtagt ccaaaaagtc 480
acgctcaggaa gcctcatggc aacgttggtt tggctgggtt gctggcggtt ctgtcctggc 540
ttccctttcc ctggctcttc tggccttcac tatttaagcg cagcccgggg agagtccacg 600
ccccctcaaca cacc 614

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

tgctacttca tcgaccc

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

aaagacacctcc cctccatct

<210> 14

<211> 4158

<212> cDNA

<213> Mouse

<400> 14

ggtgttgttga ggggcgtggaa ctctccccgg gctgcgttta aatagtgaag gccagagaga 60
ccagggaaaga ggaagccagg acagacccgc cagcacccca gccaacccaa cgttgccatg 120
aggctcctga gcgtgacttt ttggctactc cigtccctgc gcactgtcgt ctgtgtatg 180
gagggtgcgtt gggtgtaccat ctcaagacgca gagcagcaga agtgcaaaga catgagcgag 240



gccttccagg gagctggcat tcgtccttcc ctctctcg tccagggcaa ctccgctgac 300
cactgtgtcc agctcaatcaa ggaacaaaaa gcagaatgcca tccccctgga tggaggggcc 360
atctatgagg caggaaagga gcacggcctg aagccagtg tggggaaagt ctatgaccaa 420
gacattggga ctccatatta tgccgiggct gtggicagga ggaattccaa ttttaccatc 480
aacaccctga agggcgtaa gtccgtccac acaggcatta accggacigt gggctggaac 540
gtgcctgtcg ttacatcg agagagcggc catctgtcag tcatggctg tcatgtgcic 600
aaagccgttg gtgattatii tggagggcagc tggccctg gaacaggaga aaccagccat 660
tccgagtcctt ctgtcgccctt ctgccgiggc gacitctgt ggcacaatgt gtgtgacaag 720
agtccccttag agagatacta cgactacagt ggagcccttcc ggtgcctggc ggaaggagcc 780
gtgtacgtgg ctttcgigaa gcacagcaca gtgciggaaa atacigtgg aaacaccctg 840
cccttcctgg gcaagtcctt gatgtcagag gacttccagc tactatgcag ggtggcagc 900
cgagccgaca tcaactgatgg gagacgttgc caccgttccaa aggtgcctgc tcatgtgtg 960
gtggicaggg gigacatgga tggcggttc atatccaac tgcicaacga aggccagctt 1020
ctgttcagcc acgaagacag cagcttccag atgttcagct ccaaagccta cagccagaag 1080
aacttgtt tcaaagactc caccatggag ctgtgtccca ttgccacaca gaactacgag 1140
gcctggctgg gccaggaata cctgcaggcc atgaagggc tccctgtga tcccaaccgg 1200
ctgccccact acctgtcgctg gtgtgtgtcg tcaagccccg agatccagaa gtgtggagat 1260
atggctgtgg ctttcagccg ccagaatctc aagccggaaa ttcatgtgtt gtggcccgag 1320
tccccctgagc actgcattgga gcagatccag gctggcaca ctgacgtgt gactctgagg 1380
ggcgaggaca ttacaggagc agggaaagggt tacggccctgg ttccggcggc cggggagctg 1440
tatgtgttgg aggacaggag caatttcac ttgtgtggg ctgtggcaag aagggacagc 1500
tcctacttcct tcaaccctggaa cgagcttcgc ggcaagcggtt cctgcccaccc tcaacttggc 1560
agcccagcgg gctgggaggt gcccattggc tccctcatcc agcggggctt catccggccc 1620
aaggactgtg atgtcctcac agcggtgagc cagttcttca atgccagctg cgtgcctgtc 1680
aacaacccta agaactaccc ttcggacta tgcgcgtt gctacagcgg ggccttcagg 1740
cgcaacaaat gtgtggggag cagccaggag agatactacg gctacagcgg ggccttcagg 1800
tgccttgtgg agcatgcagg ggacgtggct ttgtcaagc acacgactgt ctgtgagaac 1860
acaaatggtc acaatccatgaa gccttggct tctcaccatca ggtggcaaga ctatgaacta 1920
ctgtgccccca atggggcactg ggctgaggta gaccagtcc aagcttgcacaa cctggcaca 1980



atgccatccc acgcgtcat ggtccgtcca gacaccaaca tcttcactgt gtatggactt 2040
ctggacaagg cccaggacct ttggagac gaccataaca agaacggttt ccaaagttt 2100
gactcccca aatatcacag ccaagacctg ctttcaaag atgctacagt ccgagcggtg 2160
ccagccggg agaaaaccac atacctggac tggctgggtc ctgactatgtt ggttgtcgctg 2220
gagggatgtt tgtctcagca gtgcctcggtt gcagggcccg cggtgtagcg agccccctg 2280
ctggccctgc tcctgctgac cctggctgca ggcctccctc ctgcgttctt ctgaagaccg 2340
ctgcctcagg ccacgcccag agcagggaaa gctacagagc tcaaccggaa gaaaccagga 2400
catcagctaa ccctgcagga gagcgcgggg cggatgagg agaggcaagg tgagaactca 2460
cacacacaca caagccctcg aggigcgatt ctaacccaaa gagaatttc tagaatcagg 2520
atgatgttta aggccaagtc ttccacttg ctggagccctt caataccctga ggccactggc 2580
gagtagccca gtcactccctc ccacaccgggtt ggcgccagca gcgaacctgtt gcccctcacc 2640
tggagccctcc tggctggctg gggtgtaa gggggggggg gggagagtga agatgttgtt 2700
tgccatggca accgiggagc agcttccagc ctctgtaccg gccaccctgtt gagatgcca 2760
ggaaggagca caccaccaac cttaggaaacc tggcgacac actaccaccc agcagccct 2820
gctctcgctg cccccaccgtt ctctccatgt ggcacttgtc caccaaggcc acaccgtcgg 2880
aggggcaagg ctgcgtgagca catcagccctt ctgatgtgac accaaccaag gagcccgacc 2940
ctctggacag caagattttt cttagactggg atgggaggaa ggcagagct gtactgtggg 3000
gatgaagttcc tccaaaaccc tcagaggaag gaagtgcctt caccctccca ttaagaatgt 3060
tagtgtgtga gaaacttgtt gcaggggttga aactatccctt ttaacggctt cccgtggcaa 3120
gcaggacttgc cgctgtctgc gctgccttggc ctctactgca caatgaaactt gtgtccgaga 3180
ttctattgtt tgctctccctg gtctcagtctt caacaatgtt ttctccctg ccttcataata 3240
ccccctccca catcaccacg caagcaccgca cgcgcacacg cacacgcaca cacccttacc 3300
gtgtgaacat atctgaacat atctgtttt ctgaagaagt aggagctaac ccaaataaac 3360
ttccctgtcat gagctgggcc ttggatata ccacgagcca gggatgggg gagagccctg 3420
tcttcccttc accctgcacc tggctggcag ttgcattttt cgagaggatc cctggttctc 3480
tcgaactgttgc agagccaagg cctaggctgc cattttgcca tttttcttc gagaaccaga 3540
aaaattttccaaatgcaacc agctcttacc ccagatcttgc ttccctttaaaa aaaaagtaat 3600
aaataaaaaag gagaagaaac aggagcaaacc agccatgtc agcacactgg aagcagcgtg 3660
ggccgggagc tattttgtgtc ttggctgttgc tggggggctt cagatcccaa tgacaggcca 3720



•

ggttccccagt ggctcgccccc caccgtggg cgacgacggg acagatccctt tccatggctc 3780
accagtagag aaggccctgg cagtgccca gccagagtcaca acaatccctg aggaaaatcg 3840
gtcaccaatgg tgcitgggag agcaagccccc tccicctccc agtacacagc catccattct 3900
tctctgagctt ggggacttca cagtgagaag tgcacttgtt ggggcgact gtgcgtgccca 3960
aagtgtgtatg tctgtgccgt gtgccttca ggtgtgactt tgaagagcgt tgcgtaaatg 4020
acgtctgatt gccatgggcc actgctgtgt tgcataaaa gaaagacatt ggtttctttt 4080
taaaataaaag ccatatatcc ctgcatacgc agaggcttgg atccgtgggg aaaaaaaaaa 4140
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4158

<210> 15

<211> 737

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 15

Met	Arg	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Phe	Trp	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	Thr
1					5				10					15	
Val	Val	Cys	Val	Met	Glu	Val	Gln	Trp	Cys	Thr	Ile	Ser	Asp	Ala	Glu
					20				25					30	
Gln	Gln	Lys	Cys	Lys	Asp	Met	Ser	Glu	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Gly	Ile
					35			40					45		
Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Cys	Val	Gln	Gly	Asn	Ser	Ala	Asp	His	Cys	Val
					50			55				60			
Gln	Leu	Ile	Lys	Glu	Gln	Lys	Ala	Asp	Ala	Ile	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly
					65			70			75		80		
Ala	Ile	Tyr	Glu	Ala	Gly	Lys	Glu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Val	Val	Gly
					85				90				95		
Glu	Val	Tyr	Asp	Gln	Asp	Ile	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Val	Ala	Val
					100			105				110			
Val	Arg	Arg	Asn	Ser	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Gly	Val	Lys



115	120	125
Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val		
130	135	140
Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly His Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val		
145	150	155
Leu Lys Ala Val Gly Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Thr		
165	170	175
Gly Glu Thr Ser His Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp		
180	185	190
Ser Ser Gly His Asn Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr		
195	200	205
Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val		
210	215	220
Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Asn Thr		
225	230	235
Leu Pro Ser Trp Gly Lys Ser Leu Met Ser Glu Asp Phe Gln Leu Leu		
245	250	255
Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Ile Thr Glu Trp Arg Arg Cys His		
260	265	270
Leu Ala Lys Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Gly Asp Met Asp		
275	280	285
Gly Gly Leu Ile Phe Gln Leu Leu Asn Glu Gly Gln Leu Leu Phe Ser		
290	295	300
His Glu Asp Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Gln		
305	310	315
Lys Asn Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Leu Glu Leu Val Pro Ile Ala		
325	330	335
Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Gln Glu Tyr Leu Gln Ala Met		
340	345	350



Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro His Tyr Leu Arg Trp
355 360 365
Cys Val Leu Ser Ala Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val
370 375 380
Ala Phe Ser Arg Gln Asn Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala
385 390 395 400
Glu Ser Pro Glu His Cys Met Glu Gln Ile Gln Ala Gly His Thr Asp
405 410 415
Ala Val Thr Leu Arg Gly Glu Asp Ile Tyr Arg Ala Gly Lys Val Tyr
420 425 430
Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Ala Glu Glu Asp Arg Ser
435 440 445
Asn Ser Tyr Phe Val Val Ala Val Ala Arg Arg Asp Ser Ser Tyr Ser
450 455 460
Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Pro Tyr Leu
465 470 475 480
Gly Ser Pro Ala Gly Trp Glu Val Pro Ile Gly Ser Leu Ile Gln Arg
485 490 495
Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Gln
500 505 510
Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro
515 520 525
Ser Ala Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Lys Gly Arg Asn Lys
530 535 540
Cys Val Gly Ser Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
545 550 555 560
Arg Cys Leu Val Glu His Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr
565 570 575
Thr Val Phe Glu Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ser



580	585	590
His Leu Arg Trp Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg		
595	600	605
Ala Glu Val Asp Gln Phe Gln Ala Cys Asn Leu Ala Gln Met Pro Ser		
610	615	620
His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly		
625	630	635
Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn		
645	650	655
Gly Phe Gln Met Phe Asp Ser Ser Lys Tyr His Ser Gln Asp Leu Leu		
660	665	670
Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Arg Glu Lys Thr Thr		
675	680	685
Tyr Leu Asp Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Val Ala Leu Glu Gly Met		
690	695	700
Leu Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Gly Ala Ala Val Gln Arg Val Pro		
705	710	715
Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Ala Ala Gly Leu Leu Pro Arg		
725	730	735
Val Leu		



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79,
C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79,
C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	
BIOSIS (STN)	

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1986, Vol.83, No.5, pp.1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp.3034-40	16 5-7,10
PA	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTF): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta, 28.10.1999, Vol.1447, No.2-3, pp.258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol.256, No.3, pp.503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED),	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 November, 2000 (07.11.00)

Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	25 January, 1995 (25.01.95) & JP, 7-82297, A TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No.22:1, Supplement 43	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in claims 1 to 10 of the present application pertain to chondrogenesis promoters containing as the active ingredient MTf or DNA encoding MTf.

The inventions as set forth in claims 11 and 12 of the present application pertain to chondral differentiation inhibitors containing an MTf antagonist. The active ingredient of these chondral differentiation inhibitors is different from MTf as described in claim 1. Moreover, these chondral differentiation inhibitors are used for inhibiting chondrogenesis, i.e., being contrary to claim 1. Such being the case, this group of inventions and the group of the inventions as set forth in claims 1 to 10 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The inventions as set forth in claims 13 to 15 of the present application pertain to a method of screening a substance activating MTf; the substance activating MTf obtained by the above screening method; and chondrogenesis promoters containing the above substance. Since these inventions are considered as an invention of a screening method, which falls within a category differing from the medicines containing MTf as the active ingredient as set forth in claim 1, and claims depending thereon, this group of inventions and the group of the inventions as set forth in claims 1 to 10 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The invention as set forth in claim 16 of the present application pertains to MTf with the deletion of the GPI anchor domain. Since this invention is an invention of a protein per se with unspecified use, etc., this invention and the invention of medicines as set forth in claim 1 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/05590

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl: A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl: A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN) EMBASE (STN)
 MEDLINE (STN)
 BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, Vol. 83, No. 5, pp1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 4, pp3034-40	16 5-7, 10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

森井 隆信

印

4C 2938

電話番号 03-3581-1101 内線 6460

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
P A	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta. 28. 10. 1999, Vol. 1447, No. 2-3, pp258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol. 256, No. 3, pp503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED) 25. 1月. 1995 (25. 01. 95) & JP, 7-82297, A	1-15
A	TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No. 22:1, Supplement43	9

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

本願の請求の範囲 1 - 1 0 に記載された発明は、MT f または MT f をコードするDNAを有効成分として含有する軟骨形成促進剤である。

本願の請求の範囲 1 1 - 1 2 に記載された発明は、MT f のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲 1 に記載のMT f と異なり、さらに用途も請求の範囲 1 とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲 1 - 1 0 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲 1 3 - 1 5 に記載された発明は、MT f を活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲 1 に記載の発明であるMT f を有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲 1 - 1 0 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲 1 6 に記載された発明は、GPI アンカー領域を欠損したMT f であるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲 1 に記載された発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。